

УДК 577.152.1

## КИНЕТИЧЕСКИЙ МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ БИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ФЕРМЕНТА ПРОСТАГЛАНДИН-Н-СИНТАЗЫ. ВЛИЯНИЕ ДОНОРОВ ЭЛЕКТРОНОВ НА ЦИКЛООКСИГЕНАЗНУЮ РЕАКЦИЮ\*

© 2006 г. Л.А. Цаплина<sup>1,3</sup>, Ю.О. Каратаско<sup>1,2</sup>,  
И.С. Филимонов<sup>1,2</sup>, П.В. Вржещ<sup>1,3\*\*</sup>

<sup>1</sup> Факультет биоинженерии и биоинформатики МГУ  
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-4218,  
электронная почта: peter@genebee.msu.ru

<sup>2</sup> Институт биохимической физики РАН им. Н.М. Эмануэля,  
117997 Москва, ул. Косыгина, 4; факс: (495)137-4101,  
электронная почта: asp@sky.chph.ras.ru

<sup>3</sup> Международный биотехнологический центр МГУ  
им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва; факс: (495)939-5022,  
электронная почта: info@biocentr.msu.ru

Поступила в редакцию 06.04.06

После доработки 27.06.06

Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS, К.Ф. 1.14.99.1) катализирует превращение молекулы арахидонової кислоты в простагландин  $H_2$  и обладает двумя активностями – циклооксигеназной и пероксидазной. Отсутствие конкурентных взаимоотношений и взаимная активация этих двух реакций не находят своего объяснения в рамках традиционно используемых кинетических схем. Проанализировано влияние различных доноров электронов ( $N,N,N',N'$ -тетраметил-*n*-фенилендиамин, ферроцианида калия, L-адреналина, двуаммониевой соли 2,2'-азино-ди(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты)) на скорость циклооксигеназной реакции фермента PGHS. Предложена кинетическая модель действия фермента, позволяющая описать независимое и взаимовлияющее протекание двух реакций и объяснить полученные в настоящей работе и известные из литературы экспериментальные факты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** простагландин-Н-синтаза, бифункциональный фермент, циклооксигеназная активность, кинетический механизм, ингибирование, напроксен, TMPD.

Фермент простагландин-Н-синтаза (PGHS) катализирует превращение арахидонової кислоты в простагландин  $H_2$  (PGH<sub>2</sub>) – универсальный предшественник простагландинов и тромбоксанов. Синтез PGH<sub>2</sub> из арахидонової кислоты посредством этого фермента подразделяется на два этапа [1]: превращение арахидонової кислоты в органическую перекись (простаглан-

дин G<sub>2</sub>) в результате циклооксигеназной реакции и восстановление простагландина G<sub>2</sub> до простагландина H<sub>2</sub> в результате пероксидазной реакции. Далее простагландин H<sub>2</sub> под действием специфических ферментов (конвертаз) может превращаться в физиологически активные соединения, такие как простагландины E<sub>2</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, тромбоксан A<sub>2</sub>, простаглицлин [2]. Эти вещества играют существенную роль в динамике роста опухолевых клеток, в свертывании крови, в развитии бронхиальной астмы, в воспалительных процессах. Они являются нейромодуляторами [3].

Таким образом, фермент простагландин-Н-синтаза – центральное звено цепи синтеза этих внутриклеточных регуляторов, обеспечивающее все последующие стадии универсальным «строительным материалом» (простагландином H<sub>2</sub>). У млекопитающих существуют две изоформы простагландин-Н-синтазы: PGHS-1 (постоянно

Принятые сокращения: ABTS – двуаммониевая соль 2,2'-азино-ди(3-этилбензотиазолин-6-сульфоукислоты); TMPD –  $N,N,N',N'$ -тетраметил-*n*-фенилендиамин; PGHS – простагландин-Н-синтаза; PGH<sub>2</sub> – простагландин H<sub>2</sub>; PGG<sub>2</sub> – простагландин G<sub>2</sub>; AA – арахидонової кислота; ДЭДТК – диэтилдитиокарбамат; PPIX – протопорфирин IX; ROOH – общая формула для перекисей; ROH – общая формула для спиртов.

\* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 06-093

\*\* Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

присутствует в клетках, обеспечивая нормальное их функционирование) [4] и PGHS-2 (нарабатывается в ответ на определенные стимулы, такие как цитокины или факторы роста) [5]. В настоящей работе исследовались свойства PGHS-1 из семенных пузырьков (везикулярных желез) барана.

Фермент PGHS в растворе присутствует в виде димера, состоящего из двух одинаковых субъединиц, с молекулярной массой 72 кДа [6]. Предполагается, что каждая субъединица PGHS связывает молекулу гема [7] и осуществляет катализ автономно с помощью расположенных в непосредственной близости один от другого активных центров. На одном из них протекает циклооксигеназная реакция, а на другом – пероксидазная [6]. Поскольку катализ обеих реакций осуществляется на одной молекуле фермента, возникает вопрос: как связаны между собой эти активности? Было показано, что для проявления циклооксигеназной активности фермента необходимо наличие в реакционной смеси следовых количеств перекисей. Удаление перекисей из реакционной смеси посредством добавления глутатионпероксидазы и восстановленного глутатиона приводит к появлению лаг-периода на кинетической кривой поглощения кислорода в циклооксигеназной реакции. Лаг-период устраняется при экзогенном добавлении перекисей в реакционную среду [8]. Это означает, что при протекании пероксидазной реакции нарабатывается некая активная форма фермента, способная осуществлять циклооксигеназный катализ.

Установлено [9], что при протекании пероксидазной реакции образуется радикал аминокислотного остатка тирозина. В настоящее время гипотеза о том, что радикал аминокислотного остатка Tyr385, расположенного недалеко от активного центра фермента, инициирует циклооксигеназную реакцию, достаточно обоснована [10].

Для кинетической интерпретации этих фактов в 1988 г. был предложен механизм действия PGHS, получивший название «разветвленно-цепной» механизм [11], который представлен на схеме 1. Согласно этому механизму (схема 1) после первоначального окисления молекулой перекиси (стадия 1) гемовая группа фермента получает электрон либо от внешнего донора (стадия 2), либо от аминокислотного остатка тирозина, в результате чего формируется тирозил-радикал – Tyr\* (стадия 4), который, как предполагается, участвует в осуществлении циклооксигеназного катализа.

Несмотря на то что эта схема объясняет активацию циклооксигеназного катализа при про-

текании пероксидазной реакции, у нее есть один существенный недостаток. Из нее следует, что молекула фермента либо осуществляет циклооксигеназную реакцию (стадии 5–7) и в этот момент не может катализировать пероксидазную реакцию (стадии 1–3), либо осуществляет пероксидазную реакцию и одновременно не может катализировать циклооксигеназную реакцию. Таким образом эти две активности конкурируют между собой, и увеличение концентрации субстрата одной реакции должно приводить к уменьшению скорости другой. Однако на практике этого не наблюдалось, было неоднократно показано (в частности, в работе [12]), что с увеличением концентрации донора электронов скорость циклооксигеназной реакции увеличивается. Для объяснения этого факта, который не может быть описан в рамках разветвленно-цепного механизма, был предложен альтернативный «тесно сопряженный» механизм [12, 13], представленный на схеме 2.

С помощью этого механизма можно объяснить увеличение скорости циклооксигеназной реакции с увеличением концентрации донора электронов [14]. Однако из схемы 2 следует, что циклооксигеназное окисление арахидоновой кислоты может протекать только вслед за актом окисления гемовой группы молекулой перекиси (стадия 1 на схеме 2). Если в реакционной смеси нет донора электронов, этот механизм предсказывает отсутствие циклооксигеназной реакции, так как не реализуются стадии 3 и 7 (схема 2). Это противоречит как описанному в литературе [15, 16], так и полученным в нашей работе экспериментальным данным. Тесно сопряженный механизм не может объяснить наблюдаемое в работе [17] накопление простагландина G<sub>2</sub> в ходе реакции (в присутствии донора электронов), так как молекула PGG<sub>2</sub> в отсутствие других перекисей обязательно расходуется в процессе пероксидазной реакции (стадия 1 на схеме 2). Также без объяснения остается отсутствие опреде-

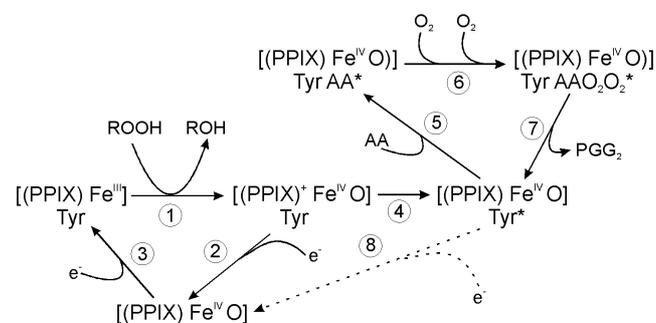


Схема 1. Разветвленно-цепной механизм действия PGHS [11]

ленной стехиометрии между прореагировавшими донором электронов и арахидоновой кислотой (измеренное отношение концентрации израсходованного донора электронов к концентрации окисленной формы арахидоновой кислоты равнялось 1,3, в то время как тесно сопряженный механизм предсказывает значение этой величины 2,0) [17].

Таким образом, можно сделать вывод, что у каждой из предлагаемых схем есть существенные недостатки и что ни одна из них не может строго описать кинетику простагландин-Н-синтазной реакции.

Одновременно продолжается математический анализ кинетических моделей действия этого фермента [18]. Из-за большой сложности исследуемой системы авторы указанных публикаций прибегают к серьезным упрощениям, в частности используют уравнение материального баланса по промежуточным формам фермента, участвующим в циклооксигеназной и пероксидазной реакциях. Это автоматически приводит к тому, что увеличение скорости одной из этих реакций приводит к уменьшению скорости другой, что, как было отмечено выше, противоречит экспериментальным данным. Авторы математически исследуют поведение системы при изменениях концентрации арахидоновой кислоты на 20 порядков, однако неадекватность исходной модели сводит практическое значение подобного рассмотрения к нулю.

По отдельности механизмы циклооксигеназной и пероксидазной реакций PGHS изучены достаточно подробно. Открытым же остается вопрос о взаимодействии этих двух активностей. Помимо того что циклооксигеназа нарабатывает субстрат для пероксидазы, обе эти реакции протекают на одной молекуле фермента, что может обуславливать некоторые особенности кинетики простагландин-Н-синтазной реакции.

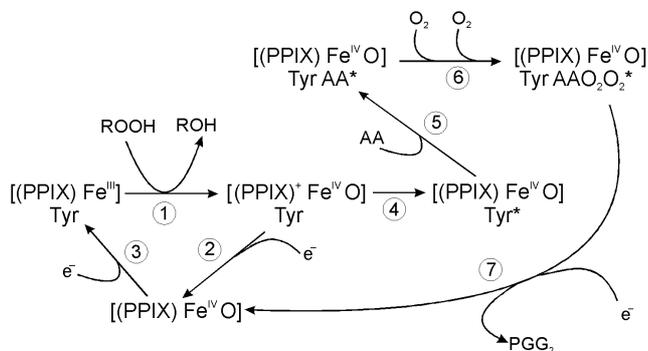


Схема 2. Тесно сопряженный механизм действия PGHS [14]

Цель работы — исследование кинетики взаимодействия пероксидазной и циклооксигеназной активностей PGHS с использованием полярографического и спектрофотометрического методов регистрации скорости реакции. Под взаимодействием двух активностей понимается влияние концентрации субстрата одной реакции на скорость другой реакции. В настоящей работе исследовали влияние доноров электронов (субстратов пероксидазной реакции) на начальную скорость циклооксигеназной реакции PGHS, а также влияние арахидоновой кислоты и ингибитора циклооксигеназы (напроксена) на пероксидазную реакцию PGHS. Естественный донор электронов для PGHS неизвестен [19]. В качестве донора электронов в нашей работе было выбрано несколько часто применяемых при исследовании кинетики PGHS веществ [20–22] (TMPD — хорошо известный одноэлектронный донор [20], ABTS — одноэлектронный донор, TMPD и ABTS — гидрофобные молекулы, которые хорошо растворяются в используемой нами реакционной смеси, так как она содержит неионный детергент Tween 20). Ферроцианид — одноэлектронный неорганический донор, L-адреналин — двухэлектронный органический донор, ферроцианид и L-адреналин — водорастворимые молекулы. Таким образом, выбранные доноры электронов охватывают широкий класс различных соединений. Пероксидазная активность фермента PGHS характеризуется отсутствием строгой специфичности по отношению к перекисным субстратам. PGHS катализирует реакцию восстановления перекисной группы у широкого круга различных по строению веществ, в том числе перекиси водорода [22], которую применяли в данной работе.

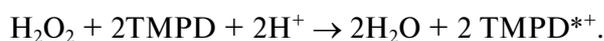
## МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Tris, Tween 20, TMPD, ABTS, напроксен, L-адреналин были произведены фирмой «MP Biomedicals Inc.» (Германия), ферроцианид — «Merck» (Германия), арахидоновая кислота, перекись водорода — «Sigma-Aldrich» (США). Остальные реактивы высокой степени чистоты были произведены в России.

Препарат фермента простагландин-Н-синтазы в виде солилилизированного препарата из микросом семенных пузырьков барана (железы получены на племзаводе «Русь», Московская обл.) выделяли методом, описанным в работе [23], с незначительными изменениями. Препарат фермента находится в следующем буфере: Tris-HCl, pH 8,0, 0,5 mM ЭДТА, 0,1 mM ДЭДТК, 1% по объему Tween 20, т.е. в 1000 мл буфера содержится 10 мл Tween 20.

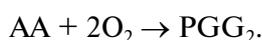
В кинетических экспериментах использовали стандартный буфер (50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 0,1% по объему Tween 20), который обычно применяют для исследования кинетики PGHS [9, 11]. Температура реакционной смеси составляла 25°. В буфер добавляли реагенты, и реакцию инициировали добавлением фермента. Растворы арахидоновой кислоты (10–150 мМ), TMPD (5–100 мМ) и напроксена (0,1 М) готовили и добавляли в реакционную смесь в виде раствора в этиловом спирте, а 0,1 М L-адреналин – растворением L-адреналина в 0,1 М соляной кислоте. Растворы ферроцианида калия (0,1 М), ABTS (75 мМ) и перекиси водорода (0,5 М) готовили в стандартном буфере. Гемин готовили по навеске, растворяя ее в небольшом количестве 0,1 М NaOH, затем разводили в 20 раз стандартным буфером. Для определения концентрации аликвоту этого раствора смешивали с 20%-ным пиридином в 0,1 М NaOH с добавлением дитионита натрия. Концентрацию гемина определяли спектрофотометрически с использованием известных коэффициентов поглощения ( $\epsilon$ ) для восстановленного комплекса гемина с пиридином [24].

**Пероксидазная реакция.** Для проведения этой реакции в реакционную смесь вносили перекись водорода, TMPD или ABTS и фермент. Регистрировали накопление концентрации окисленной формы донора электронов. В случае TMPD стехиометрическое уравнение выглядит следующим образом:



За протеканием пероксидазной реакции PGHS (накопление окисленной формы TMPD) наблюдали с помощью спектрофотометра. Для этого использовали спектрофотометр «Cary 100» («Varian Inc.», США). Длина волны, на которой проводилась детекция, равнялась 611 нм,  $\epsilon = 13\,500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  для окисленной молекулы TMPD, которая находится в стехиометрическом соотношении 2 : 1 к молекуле перекиси [21]. Регистрировали полную кинетическую кривую окисления донора в реальном времени. Объем реакционной смеси составлял 2,5 мл, объем добавляемого раствора фермента (с концентрацией белка 4,5 мг/мл) обычно составлял 10 мкл.

**Циклооксигеназная реакция.** В реакционную смесь вносили донора электронов, арахидоновую кислоту и фермент, и регистрировали изменение концентрации растворенного кислорода:



За протеканием циклооксигеназной реакции наблюдали с использованием анализатора

кислорода «Экотест-120/АТС» (ООО НПП «Эконикс», Россия), снабженного газодиффузионным платиносеребряным электродом Кларка (амперометрический способ) [25]. Регистрировали полную кинетическую кривую потребления растворенного кислорода в реальном времени. Объем реакционной смеси составлял 1,7 мл, объем добавляемого раствора фермента (с концентрацией белка 4,5 мг/мл) обычно составлял 10 мкл.

**Ингибирование циклооксигеназной реакции напроксеном.** В качестве ингибитора циклооксигеназы использовали напроксен в концентрации 1 мМ в реакционной смеси. Напроксен вносили в реакционную смесь до добавления фермента или на пятой или десятой секунде от начала реакции для следующих катализируемых PGHS реакций:

циклооксигеназной реакции, когда в буфер вносили ABTS, гемин, арахидоновую кислоту и 5 мкл раствора фермента (с концентрацией белка 9 мг/мл). Измерения проводили на полярографе АКПМ-02-05 (ООО «Альфа БАССЕНС», Россия) с использованием газодиффузионного платиносеребряного электрода Кларка [25]. Объем ячейки составлял 3 мл;

пероксидазной реакции, когда в буфер вносили ABTS, перекись водорода и 1,5 мкл раствора фермента (с концентрацией белка 9 мг/мл). Для некоторых экспериментов к смеси для пероксидазной реакции добавляли раствор арахидоновой кислоты. Измерения проводили на спектрофотометре «Cary 100». Длина волны, на которой проводилась детекция, равнялась 405 нм. Для молекулы ABTS, находящейся в стехиометрическом соотношении 2 : 1 к молекуле перекиси,  $\epsilon = 36\,800 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  [26]. Регистрировали полную кинетическую кривую окисления донора в реальном времени.

Контрольные эксперименты проводили в тех же условиях без ингибитора. Концентрации реагентов указаны в подписях к рисункам.

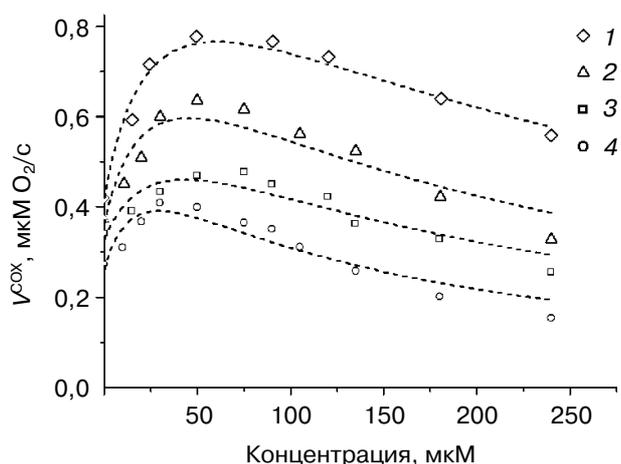
Математическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета для обработки данных Origin 6.1 (Microcal Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

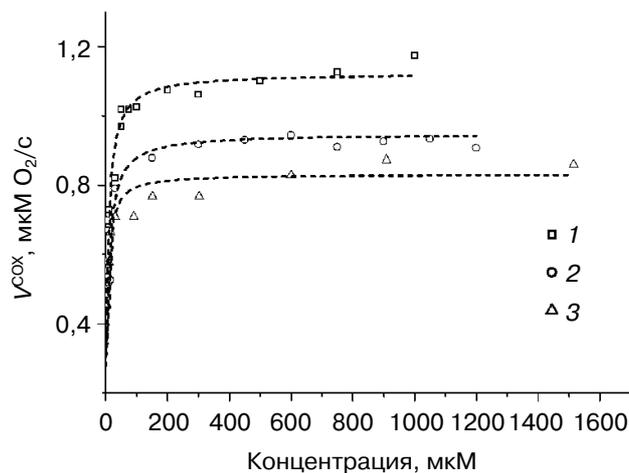
Поскольку PGHS катализирует циклооксигеназную и пероксидазную реакции только в виде холофермента (комплекса с геминем) [7], необходимо решить вопрос о добавлении в реакционную смесь экзогенного гемина. В экспериментах по определению зависимости скорости циклооксигеназной реакции PGHS от концент-

рации гемина было установлено, что в используемом солюбилизованном препарате PGHS содержится 83% фермента в холоформе и 17% – в апоформе. В настоящей работе использовали солюбилизованный препарат PGHS без добавления экзогенного гемина. Случаи, при которых в реакционную смесь добавляли экзогенный гемин, отмечены в подписях к рисункам.

При увеличении концентрации TMPD до определенного значения скорость циклооксигеназной реакции повышается, а при дальнейшем увеличении концентрации – понижается (рис. 1). Для многих доноров (МК-447 [15], фенола [16], гваякола [27], ацетаминофена [28], диметилфенилендиамина [27], метилфенилсульфида [29]) описано стимулирование циклооксигеназной активности при низких концентрациях и ингибирование при высоких. Однако ингибирование циклооксигеназной реакции при высоких концентрациях доноров электронов характерно не для всех доноров. Так, L-адреналин, ферроцианид, ABTS не проявляют подобных свойств в большом диапазоне концентраций (рис. 2). Следовательно, способность ингибировать циклооксигеназную реакцию не является неотъемлемой чертой всех доноров электронов, а зависит от природы последних. В литературе приводятся гипотезы о возможных причинах ингибирующего действия доноров электронов на циклооксигеназную реакцию. Во-первых, это может быть связано с тем, что присутствие доноров в растворе ведет к неферментативному удалению пе-



**Рис. 1.** Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации TMPD при концентрациях арахидоновой кислоты 180, 100, 75, 40 мкМ (1–4 соответственно). Условия описаны в разд «Методы исследования». Кривые построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (9) (найденные значения параметров приведены в таблице)

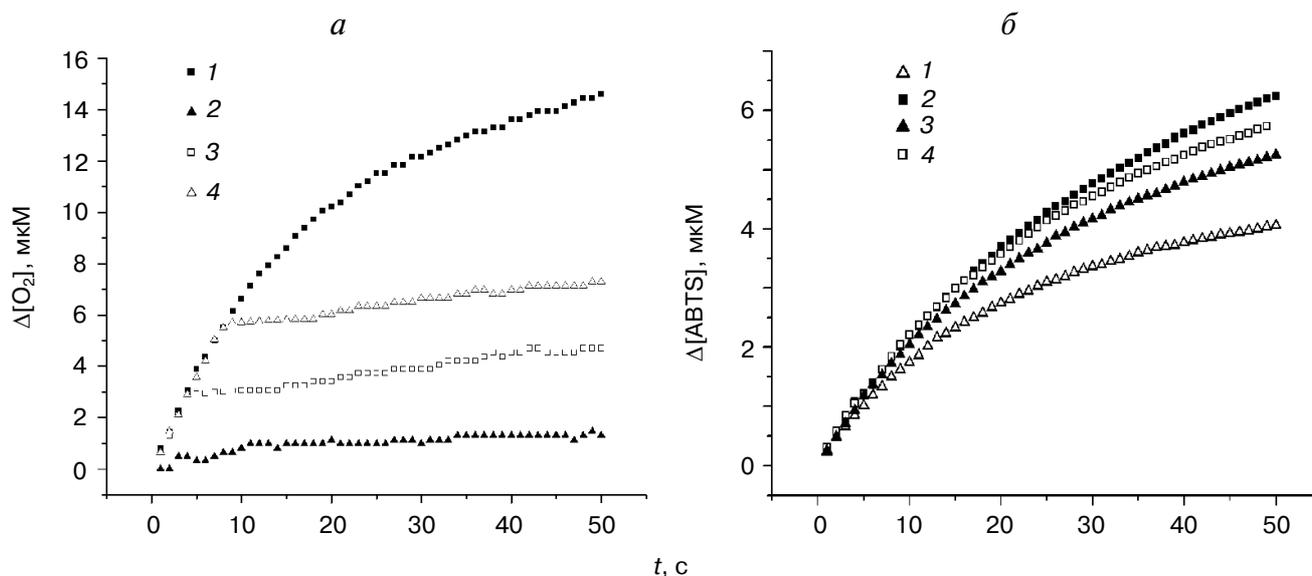


**Рис. 2.** Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации донора электронов. Концентрация арахидоновой кислоты – 100, гемина – 2 мкМ. Кривые построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (9). 1 – ABTS,  $K_6 = 0$ ,  $V_1/V_2 = 2,2$ ,  $K_1/K_2 = 28$ ,  $V_2 = 0,58$ ; 2 – L-адреналин,  $K_6 = 0$ ,  $V_1/V_2 = 1,6$ ,  $K_1/K_2 = 3$ ,  $V_2 = 0,52$ ; 3 – ферроцианид,  $K_6 = 0$ ,  $V_1/V_2 = 1,8$ ,  $K_1/K_2 = 15$ ,  $V_2 = 0,5$

рекиси [27], которая является активатором циклооксигеназы. Во-вторых, доноры могут взаимодействовать с радикалами, включая тирозил-радикал, присутствие которого в активном центре циклооксигеназы необходимо для осуществления циклооксигеназной реакции [8]. В-третьих, доноры могут конкурентно взаимодействовать с центром связывания субстрата циклооксигеназы [30]. Возможно также, что к такому эффекту приводит некая комбинация перечисленных причин.

Было показано (данные не приводятся), что добавление перекиси водорода в концентрации 140 мкМ не элиминирует ингибирующего действия TMPD. Это означает, что гипотеза о нехватке перекиси (которая является активатором циклооксигеназы), при высоких концентрациях донора электронов не объясняет экспериментальных фактов в данном случае. Еще один факт, также подтверждающий, что в описанных экспериментах нет недостатка перекиси, следующий: на кинетических кривых (рис. 3) не наблюдается лаг-период (при удалении перекисей из реакционной смеси посредством добавления глутатионпероксидазы и восстановленного глутатиона наблюдался лаг-период на кинетических кривых поглощения кислорода [8]).

Из гипотезы о том, что TMPD взаимодействует с активным центром циклооксигеназы полностью неконкурентно по отношению к АА,



**Рис. 3.** Влияние напроксена на кинетику циклооксигеназной реакции (а) и пероксидазной реакции в присутствии арахидоновой кислоты (б). а – АВТС – 750 мкМ, АА – 150 мкМ, гемин – 2 мкМ, РГНС – 15 мкг/мл (контроль); контроль + напроксен (1 мМ, добавлен до внесения фермента); контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на пятой секунде реакции); контроль + напроксен (1 мМ, добавлен на десятой секунде реакции) (1–4 соответственно). б – АВТС – 750 мкМ,  $H_2O_2$  – 1,5 мМ, РГНС – 5,4 мкг/мл (контроль); контроль + арахидоновая кислота (150 мкМ, добавлена до внесения фермента); контроль + напроксен (1 мМ, добавлен до внесения фермента); контроль + арахидоновая кислота (150 мкМ) и напроксен (1 мМ), добавленные до внесения фермента (1–4 соответственно)

уменьшая концентрацию тирозил-радикала, следует, что изменение концентрации арахидоновой кислоты не должно влиять на характер ингибирующего действия TMPD. Однако на практике увеличение концентрации арахидоновой кислоты приводит к тому, что максимальная скорость реакции достигается при более высоких концентрациях TMPD (рис. 1). Следовательно, гипотеза о неконкурентном ингибировании в чистом виде также несостоятельна.

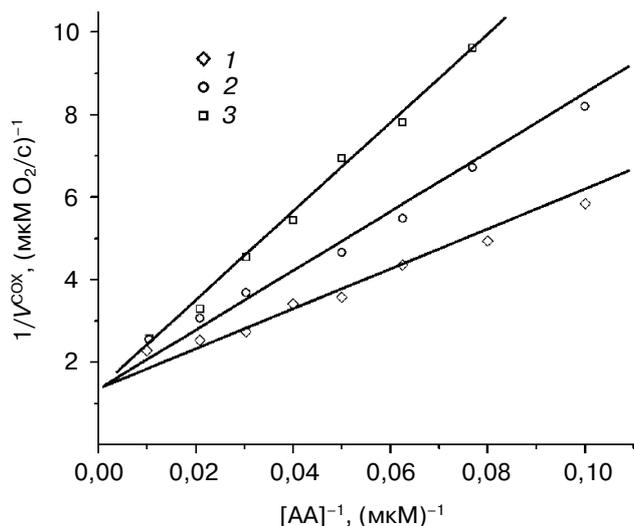
Таким образом, для объяснения эффекта ингибирования циклооксигеназной реакции РГНС при высоких концентрациях донора электронов TMPD необходимо учесть возможность конкурентного по отношению к АА взаимодействия TMPD с центром связывания субстрата циклооксигеназной реакции.

Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции при фиксированной концентрации TMPD от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах представлена на рис. 4. При этих значениях концентрации TMPD наблюдается ингибирование циклооксигеназной реакции (рис. 1). В случае неконкурентного взаимодействия в чистом виде, наблюдалось бы пересечение прямых на оси абсцисс, что не соответствует экспериментальным данным. Поэтому факт наличия точек пе-

ресечения прямых на рис. 4 в правом верхнем квадранте подтверждает предположения о характере взаимодействия молекулы TMPD с центром связывания субстрата циклооксигеназной реакции. Из этого рисунка видно, что зависимость линейна в двойных обратных координатах. Следовательно, можно сделать вывод, что механизм взаимодействия фермента с арахидоновой кислотой можно описать в рамках модели Михаэлиса.

Влияние ингибитора циклооксигеназной реакции (напроксена) на протекание циклооксигеназной и пероксидазной реакций показано на рис. 3. Напроксен относится к нестероидным противовоспалительным препаратам и является хорошо известным быстрым обратимым конкурентным ингибитором циклооксигеназной реакции РГНС [3]. Добавление напроксена вызывает быстрое практически полное подавление циклооксигеназной активности РГНС (рис. 3, а). Присутствие напроксена во время пероксидазной реакции не влияет на начальную скорость (рис. 3, б), а лишь уменьшает константу скорости инактивации РГНС в ходе этой реакции по сравнению с контролем.

Присутствие арахидоновой кислоты (и арахидоновой кислоты совместно с напроксеном) во время пероксидазной реакции также не вли-



**Рис. 4.** Зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции при фиксированных концентрациях TMPD 60, 90, 135 мкМ (1–3 соответственно) от концентрации арахидоновой кислоты в двойных обратных координатах. Сплошные линии построены при аппроксимации экспериментальных данных согласно уравнению (9);  $K_1/K_2 = 2$ ,  $V_1 = 0,75$ ,  $V_2 = 0,22$ ,  $K_3 = 1,3$ ,  $K_4 = 0,44$

яет на начальную скорость и уменьшает константу скорости инактивации PGHS в ходе этой реакции по сравнению с контролем (рис. 3, б). Эти результаты свидетельствуют о том, что заполнение активного центра циклооксигеназной реакции арахидоновой кислотой или ингибитором практически не влияет на начальную скорость пероксидазной реакции. Влияние напроксена и арахидоновой кислоты на константу скорости инактивации фермента в процессе пероксидазной реакции в рамках данной работы не обсуждается. Таким образом, можно сделать вывод, что начальная скорость пероксидазной реакции PGHS не зависит от протекания циклооксигеназной реакции. В отдельных экспериментах было показано (данные не приводятся), что при добавлении арахидоновой кислоты к смеси для проведения пероксидазной реакции (рис. 3, б) одновременно с пероксидазной протекает циклооксигеназная реакция. Последняя ингибируется перекисью водорода на 10–20% (по сравнению с циклооксигеназной реакцией без перекиси водорода). Эти факты будут использованы при построении кинетической модели.

Наши экспериментальные результаты и данные, полученные другими исследователями, требуют от кинетической модели PGHS объяснения следующих экспериментальных результа-

тов: в отсутствие донора электрона циклооксигеназная реакция идет, в присутствии донора электрона скорость циклооксигеназной реакции увеличивается, для некоторых доноров увеличение переходит в ингибирование. Ингибирование циклооксигеназной реакции не приводит к изменению скорости пероксидазной реакции PGHS. Циклооксигеназная и пероксидазная реакции идут одновременно, и нет явных признаков конкурентных взаимоотношений между ними.

**Построение кинетических моделей.** Выше уже было показано, что существующие схемы разветвленно-цепного и тесно сопряженного механизмов не могут объяснить всей совокупности экспериментальных данных, известных для этого фермента. Более того, любые кинетические модели PGHS, предусматривающие общий материальный баланс по всем интермедиатам фермента, осуществляющим циклооксигеназную и пероксидазную реакции, будут характеризоваться конкуренцией между двумя активностями, т.е. подавлением циклооксигеназной реакции при протекании пероксидазной и наоборот. В то же время, как указывалось выше, имеются достаточно веские свидетельства прямо противоположного – в присутствии донора электронов скорость циклооксигеназной реакции существенно увеличивается. Становится очевидным, что использование моделей с общим материальным балансом здесь принципиально невозможно, так как кинетические модели PGHS должны учитывать независимое протекание двух ферментативных реакций, не исключаящее взаимовлияния этих реакций. В настоящей работе на основании теоретических разработок обобщенных кинетических моделей бифункционального фермента [31, 32] предложена кинетическая схема действия PGHS, предусматривающая независимое протекание двух ферментативных реакций на одной молекуле фермента, но не постулирующая отсутствие взаимовлияния этих реакций (схема 3). В ходе активации фермента перекисью водорода образование тирозил-радикала в достаточном количестве для циклооксигеназной реакции происходит быстро (спустя 1–2 с после начала реакции) [33]. На схеме 3 процесс образования тирозинового радикала не отражен, так как мы рассматриваем работу фермента в стационарном приближении. Правомерность такого рассмотрения подтверждается отсутствием лаг-периода в наших экспериментах.

Завершение цикла в вертикальном направлении (схема 3) соответствует одному обороту пероксидазной реакции, завершение цикла в горизонтальном направлении – одному обороту

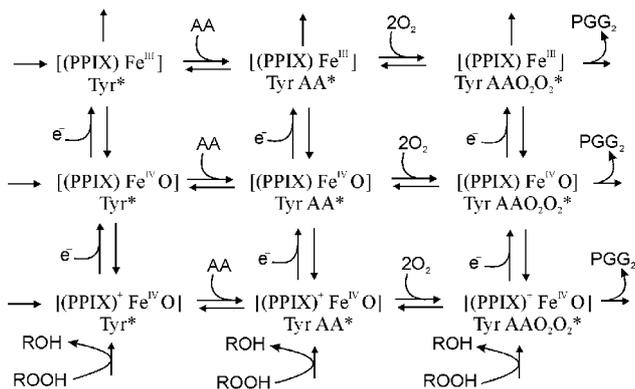


Схема 3. Предполагаемая схема действия простагландин-Н-синтазы

циклооксигеназной реакции. Принципиальное отличие этой схемы от всех предлагавшихся ранее состоит в том, что материальный баланс составляется отдельно по всем возможным промежуточным состояниям фермента, и реакции могут протекать по разным маршрутам.

Для схемы 3 зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации донора электронов в стационарном режиме выражается следующим образом [32]:

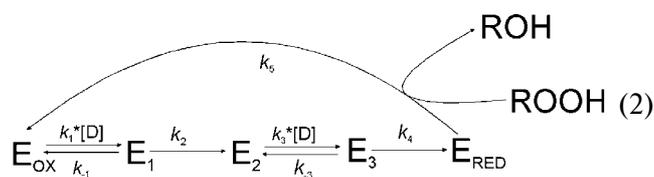
$$v^{COX} = \frac{e_0 + e_1[D] + e_2[D]^2 + e_3[D]^3 + e_4[D]^4}{d_0 + d_1[D] + d_2[D]^2 + d_3[D]^3 + d_4[D]^4}, \quad (1)$$

где  $[D]$  – концентрация донора электронов, константы  $e_i$  и  $d_i$  выражаются через константы скоростей элементарных стадий и концентрации других участников реакции, причем  $e_i \neq 0$  ( $0 \leq i \leq 4$ ),  $d_i \neq 0$  ( $0 \leq i \leq 4$ ).

Такая зависимость, при определенных соотношениях между константами  $e_i$  и  $d_i$  описывает стимулирование циклооксигеназной реакции с увеличением концентрации донора электронов. Схема 3 не противоречит факту накопления в реакционной смеси простагландина  $G_2$ . Таким образом, этот подход лучше описывает известные закономерности кинетики PGHS, чем разветвленно-цепной или тесно сопряженный механизмы реакции. В принципе формулой (1) можно описать не только увеличение скорости циклооксигеназной реакции при малых концентрациях донора электронов, но и ее уменьшение при больших. Однако, как уже отмечено выше, способность ингибировать циклооксигеназную реакцию зависит от природы донора электронов и не присуща всем донорам. Поэтому это явление необходимо описать отдельно.

Схема 3 позволяет объяснить все имеющиеся экспериментальные данные, но она довольно сложна для анализа. Качественное исследование схемы 3 проведем с использованием экспериментально обоснованных упрощений. Предположим, что протекание циклооксигеназной реакции не влияет на скорость пероксидазной реакции. Это подтверждается литературными данными [34, 35] и полученными нами экспериментальными результатами (рис. 3).

Полагая, что скорость циклооксигеназной реакции, катализируемой ферментом, зависит от того, в каком состоянии находится активный центр пероксидазной реакции, рассмотрим следующую схему пероксидазной реакции:



Здесь и далее  $D$  – донор электронов TMPD,  $E$  характеризует состояние пероксидазного активного центра ( $E_{RED}$  –  $[(PPIX) Fe^{III}]$ ,  $E_{OX}$  –  $[(PPIX^*)^+ Fe^{IV} O]$ ,  $E_1$  и  $E_3$  – фермент-субстратные комплексы с донором электронов ( $E_1$  –  $[(PPIX^*)^+ Fe^{IV} O]D$ ,  $E_3$  –  $[(PPIX) Fe^{IV} O]D$ ), а  $E_2$  – полувосстановленная форма фермента  $[(PPIX) Fe^{IV} O]$ ,  $k_i$   $i = 1, -1, 2, 3, -3, 4, 5$  – константы скоростей соответствующих элементарных стадий реакции. Предусматривается, что каждая из промежуточных форм фермента способна осуществлять циклооксигеназный катализ.

Вычислим стационарные концентрации каждой промежуточной формы фермента, участвующей в пероксидазной реакции. Разделим промежуточные формы фермента на две группы в соответствии с тем, как зависит их концентрация от концентрации донора электронов. Тогда в одну группу войдут  $E_{OX}$  и  $E_2$ , а в другую –  $E_{RED}$ ,  $E_1$  и  $E_3$ . Введя обозначения

$$[E^1] = [E_1] + [E_3] + [E_{RED}], \quad (3)$$

$$[E^2] = [E_{OX}] + [E_2], \quad (4)$$

получим

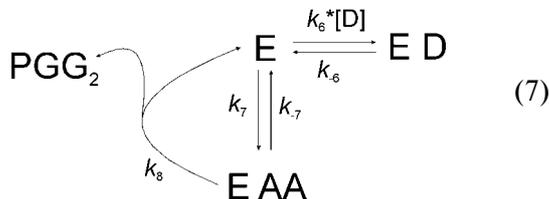
$$[E^1] = [E_0] \frac{K_2[D]}{K_1 + K_2[D]}, \quad (5)$$

$$[E^2] = [E_0] \frac{K_1}{K_1 + K_2[D]}, \quad (6)$$

где константы  $K_1$  и  $K_2$  выражаются через кон-

танты скоростей элементарных стадий пероксидазной реакции.

Для циклооксигеназной реакции с учетом того, что донор электронов может конкурентно взаимодействовать с центром связывания арахидоновой кислоты (7),



введем следующие обозначения: E – молекула фермента с тирозил-радикалом;  $v^{\text{COX}}$  – наблюдаемая стационарная скорость циклооксигеназной реакции;  $v^1$  – стационарная скорость циклооксигеназной реакции, которая катализируется формами фермента, входящими в первую группу;  $v^2$  – стационарная скорость циклооксигеназной реакции, которая катализируется формами фермента, входящими во вторую группу. Тогда

$$v^{\text{COX}} = v^1 + v^2, \quad (8)$$

Предположим, что константы скорости циклооксигеназного катализа одинаковы для форм фермента, входящих в одну группу, и что выполняется квазиравновесное приближение, т.е. для каждой формы фермента  $k_8 \ll k_{-7}$ , и что для каждого состояния фермента все константы скорости циклооксигеназной реакции равны, за исключением  $k_8$ , определяющей скорость наработки простагландина  $G_2$ . Константам  $k_8$  будем приписывать верхние индексы 1 и 2 для первой и второй групп соответственно. Тогда

$$v^{\text{COX}} = \frac{K_1 V_2 + K_2 V_1 [\text{D}]}{K_1 + K_2 [\text{D}]} \frac{[\text{AA}]}{[\text{AA}] + K_3 (1 + K_4 [\text{D}])}, \quad (9)$$

$$V_1 = k_8^1 [E_0], \quad V_2 = k_8^2 [E_0], \quad K_3 = \frac{k_{-7}}{k_7}, \quad K_4 = \frac{k_6}{k_{-6}} \quad (10)$$

Согласно уравнению (9) зависимость начальной скорости циклооксигеназной реакции от концентрации арахидоновой кислоты линейна в двойных обратных координатах, что согласуется с экспериментальными данными (рис. 4).

В уравнение (9) входят шесть констант. Для оценки их значений большое число экспери-

ментальных данных (часть из которых представлена на рис. 1) аппроксимировали согласно этой формуле методом нелинейной регрессии. Чтобы уменьшить опасность попадания в локальный минимум, начальные значения констант при аппроксимации варьировали в широких пределах. При этом получали один и тот же результат. Это свидетельствует о том, что уравнение (9) не противоречит полученным экспериментальным результатам и при данных значениях этих констант хорошо их описывает (рис. 1, 2, 4). Это служит подтверждением правильности наших предположений о механизме влияния TMPD на протекание циклооксигеназной реакции. Результаты аппроксимации приведены в таблице.

Константа	Размерность	Среднее значение	Дисперсия
V1	мкМ/с	0,66	0,15
V2	мкМ/с	0,22	0,05
K1	мкМ <sup>-1</sup> · с <sup>-4</sup>	12,00	3,00
K2	мкМ <sup>-3</sup> · с <sup>-4</sup>	0,81	0,14
K3	мкМ	1,30	0,30
K4	мкМ <sup>-1</sup>	0,44	0,08

ментальных данных (часть из которых представлена на рис. 1) аппроксимировали согласно этой формуле методом нелинейной регрессии. Чтобы уменьшить опасность попадания в локальный минимум, начальные значения констант при аппроксимации варьировали в широких пределах. При этом получали один и тот же результат. Это свидетельствует о том, что уравнение (9) не противоречит полученным экспериментальным результатам и при данных значениях этих констант хорошо их описывает (рис. 1, 2, 4). Это служит подтверждением правильности наших предположений о механизме влияния TMPD на протекание циклооксигеназной реакции. Результаты аппроксимации приведены в таблице.

В данной работе предложена кинетическая схема действия PGHS, предусматривающая независимое протекание двух ферментативных реакций на одной молекуле фермента, сопровождающееся взаимным влиянием этих реакций друг на друга. Экспериментальные результаты описывает упрощенная модель, учитывающая конкуренцию между TMPD и арахидоновой кислотой и предусматривающая повышение циклооксигеназной активности PGHS при пероксидажном восстановлении гемовой группы донором электронов.

Авторы выражают благодарность А.Ф. Албантову («Альфа БАССЕНС», Россия) за предоставление прибора АКПМ-02-05 и газодиффузионного платиносеребряного электрода Кларка, консультации и помощь в работе.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hamberg, M., and Samuelsson, B. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 899–903.
- Bergstrom, S., Danielsson, H., and Samuelsson, B. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **90**, 207–210.
- Варфоломеев С.Д., Мевх А.Т. (1985) *Простагландины – молекулярные биорегуляторы*, Изд-во МГУ, Москва.
- Yokoyama, C., and Tanabe, T. (1989) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**, 888–894.
- Jones, D.A., Carlton, D.P., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A., and Prescott, S.M. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 9049–9054.
- Smith, W.L., Garavito, R.M., and DeWitt, D.L. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**, 33157–33160.
- Roth, G.J., Machuda, E.D. and Strittmatter, P. (1981) *J. Biol. Chem.*, **254**, 10018–10022.
- Hemler, M.E., Graff, G., and Lands, W.E. (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **85**, 1325–1331.
- Karthein, R., Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 313–320.
- Shimokawa, T., Kulmacz, R.J., DeWitt, D.L., and Smith, W.L. (1990) *J. Biol. Chem.*, **265**, 20073–20076.
- Dietz, R., Nastainczyk, W., and Ruf, H.H. (1988) *Eur. J. Biochem.*, **171**, 321–328.
- Hsuanyu, Y., and Dunford, H.B. (1992) *J. Biol. Chem.*, **267**, 17649–17657.
- Bakovic, M., and Dunford, H.B. (1994) *Biochemistry*, **33**, 6475–6482.
- Koshkin, V., and Dunford, H.B. (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1430**, 341–348.
- Kuehl, F.A., Humes, J.L., Egan, R.W., Ham, E.A., Beveridge, G.C., and Van Arman, C.G. (1977) *Nature*, **265**, 170–173.
- Egan, R.W., Paxton, J., and Kuehl, F.A. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7329–7335.
- Kulmacz, R.J., Tsai, A.-L., and Wei, C. (1995) *Biochemistry*, **34**, 8499–8512.
- Hazelton, W.D., Tien, J.H., Donato, V.W., Sparks, R., and Ulrich, C.M. (2004) *Biochem. Pharmacol.*, **68**, 423–432.
- Markey, C.M., Alward, A., Weller, P.E., and Marnett, L.J. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 6266–6279.
- Kulmacz, R.J. (1987) *Prostaglandins*, **34**, 225–240.
- Kulmacz, R.J., Ren, Y., Tsai, A.-L., and Palmer G. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8760–8771.
- Ohki, S., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1979) *J. Biol. Chem.*, **254**, 829–836.
- Van der Ouderaa, F.J., Buytenhek, M., Nugteren, D.H., and Van Dorp, D.A. (1977) *Biochim. Biophys. Acta*, **487**, 315–331.
- Falk, J.E. (1964) in *Porphyrins and Metalloporphyrins*, vol. 2, Elsevier Amsterdam, New York–London, p. 181.
- Франк Г.М., Кондрашова М.Н., Мохова Е.Н., Ротенберг Ю.С. (1973) *Руководство по изучению биологического окисления полярографическим методом*, Наука, Москва.
- Кузнецова Ю.А., Ромах В.Б., Строкин М.Л., Мевх А.Т. (1998) *Вестн. МГУ*, **39**, 302–304.
- Egan, R.W., Gale, P.H., Beveridge, G.C., Marnett, L.J., and Kuehl, F.A. (1980) *Adv. Prostaglandin Thromboxane Res.*, **6**, 153–155.
- Robak, J., Wieckowski, A., and Gryglewski, R. (1978) *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 393–396.
- Egan, R.W., Gale, P.H., Baptista, E.M., Kenicott, K.L., VandenHeuvel, W.J.A., Walker, R.W., Fagerness, P.E., and Kuehl, F.A. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 7352–7361.
- Humes, J.L., Winter, C.A., Sadowski, S.J., and Kuehl, F.A. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 2053–2056.
- Vrzhesch, P.V., Batanova, E.A., Mevkh, A.T., Varfolomeev, S.D., Gazaryan, I.G., and Thorneley, R.N.F. (2003) *Biochem. J.*, **372**, 713–724.
- Вржеш П.В. (1999) *Биохимия*, **64**, 502–512.
- Kulmacz, R.J., Marsall, P.J., and Lands, W.E. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**, 3510–3517.
- Miyamoto, T., Ogino, N., Yamamoto, S., and Hayaishi, O. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 2629–2636.
- Roth, G.J., and Siok, C.J. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 3782–3784.

## KINETIC MECHANISM OF ACTION OF THE BIFUNCTIONAL ENZYME PROSTAGLANDIN-H-SYNTASE. INFLUENCE OF ELECTRON DONORS ON THE CYCLOOXYGENASE REACTION

L. A. Tsaplina<sup>1,3</sup>, Yu. O. Karatasso<sup>1,2</sup>, I. S. Filimonov<sup>1,2</sup>, P. V. Vrzhesch<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Bioengineering and Bioinformatics M. V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow; fax: (495)939-4218, E-mail: peter@genebee.msu.ru

<sup>2</sup> N. M. Emanuel Institute of Biochemical Physics, Russian Academy of Sciences, ul. Kosygina 4, 117997 Moscow, Russia; fax: (495)137-4101, E-mail: asp@sky.chph.ras.ru

<sup>3</sup> International Research Center for Biochemical Technology M. V. Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; fax: (495)939-5022, E-mail: info@biocentr.msu.ru

Received April 6, 2006

Revision received June 27, 2006

The enzyme prostaglandin-H-synthase (PGHS) carries out the conversion of an arachidonic acid molecule into prostaglandin H<sub>2</sub>. For this PGHS carries out two reactions: the cyclooxygenase reaction, and the peroxidase one. The absence of competition between and the cross activation of the two reactions cannot be explained on the basis of existing kinetic schemes. We have studied the influence of different electron donors (N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine, L-epinephrine, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, potassium hexacyanoferrate(II)) on the PGHS activities. The proposed scheme describes the independent (but influencing each other) cyclooxygenase and peroxidase activities of PGHS. It also explains experimental data gained in the present work and known from the literature.

**Key words:** prostaglandin-H-synthase, bifunctional enzyme, cyclooxygenase activity, kinetic mechanism, inhibition, naproxen, TMPD